

PEPTIDES CAPABLE OF INHIBITING THE ENDOCYTOSIS OF THE APP AND CORRESPONDING NUCLEOTIDE SEQUENCES

Publication number: JP2001503988 (T)

Publication date: 2001-03-27

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: A61K31/711; A61K35/76; A61K38/00; A61K39/395; A61P25/00; A61P25/28; A61P43/00; C07K14/47; C07K16/18; C12N15/09; C12N15/12; C12Q1/68; G01N33/68; A61K31/711; A61K35/66; A61K38/00; A61K39/395; A61P25/00; A61P43/00; C07K14/435; C07K16/18; C12N15/09; C12N15/12; C12Q1/68; G01N33/68; (IPC1-7): A61K31/711; A61K35/76; A61K38/00; A61K39/395; A61P25/00; A61P43/00; C07K14/47; C07K16/18; C12N15/09; C12Q1/68

- European: C07K14/47A1; C07K14/47A3; G01N33/68V2

Application number: JP19980522222T 19961108

Priority number(s): WO1996FR01775 19961108

Also published as:

WO9821327 (A1)

EP0941319 (A1)

CA2268018 (A1)

Abstract not available for JP 2001503988 (T)

Abstract of corresponding document: WO 9821327 (A1)

The invention concerns novel peptide and nucleotide sequences, and their pharmaceutical use. More particularly, it concerns novel peptide capable of inhibiting at least partially the phenomenon of APP endocytosis by intervening at the level of the interaction of the FE65 protein with the cytoplasmic region of the APP.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2001-503988

(P2001-503988A)

(43)公表日 平成13年3月27日 (2001.3.27)

(51)Int.Cl.⁷
 C 12 N 15/09
 A 61 K 31/711
 35/76
 38/00
 39/395

識別記号
 Z N A

F I
 C 12 N 15/00
 A 61 K 31/711
 35/76
 39/395
 A 61 P 25/00

マーク* (参考)

Z N A A

N

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-522222
 (86) (22)出願日 平成8年11月8日 (1996.11.8)
 (85)翻訳文提出日 平成11年4月9日 (1999.4.9)
 (36)国際出願番号 PCT/FR96/01775
 (87)国際公開番号 WO98/21327
 (87)国際公開日 平成10年5月22日 (1998.5.22)
 (81)指定国 E P (AT, BE, CH, DE,
 DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
 MC, NL, PT, SE), CA, JP, US

(71)出願人 ローヌーブーラン・ロレ・エス・アーフ
 フランス国、エフー-92160・アントニー、
 アブニユ・レイモン・アロン、20
 (72)発明者 メルケン、リュツク
 フランス国、エフー-94100・サン・モー、
 リュ・ジユル・ジョフラン、18・ビス
 (72)発明者 フルニエ、アラン
 フランス国、エフー-92290・シヤテネ・マ
 ラブリ、アブニユ・ロジエ・サレンゴロ、
 28
 (74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

(54)【発明の名称】 APPのエンドサイトーシスを阻害し得るペプチド及び対応するスクレオチド配列

(57)【要約】

本発明は、新規なペプチド及びスクレオチド配列とその医薬的使用に関する。より特定的には本発明は、FE65タンパク質とAPPの細胞質領域との相互作用のレベルに干渉することによってAPPのエンドサイトーシス現象を少なくとも部分的に阻害し得る新規なペプチドに関する。

【特許請求の範囲】

1. F E 6 5 タンパク質またはその相同形態の 1 つと A P P の細胞質領域との相互作用のレベルに干渉し得ることを特徴とするペプチド。
2. 干渉が、前記相互作用の低減、阻害または刺激であることを特徴とする請求項 1 に記載のペプチド。
3. F E 6 5 タンパク質またはその相同形態の 1 つと A P P の細胞質領域との相互作用ドメインの処に結合し得ることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のペプチド。
4. 配列 1、配列 2 またはこれらの配列の誘導体の 1 つの全部または一部を含むことを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のペプチド。
5. F E 6 5 タンパク質またはその相同形態の 1 つと A P P の細胞質領域との相互作用ドメインのレベルで請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のペプチドと競合し得るペプチド。
6. 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドの活性モチーフを非ペプチド構造または非ペプチド単独構造で複製することによって得られた F E 6 5 タンパク質と A P P の細胞質領域との相互作用を変調し得る非ペプチドまたは非ペプチド単独の化合物。
7. 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列。
8. 配列 1、配列 2 またはこれらの配列に由来の 1 つの配列の全部または一部を含む配列であることを特徴とする請求項 7 に記載のヌクレオチド配列。
9. ウィルス性または非ウィルス性のベクターに導入された請求項 7 または 8 に記載の配列。
10. 請求項 7 または 8 に記載の配列のアンチセンスオリゴヌクレオチド。
11. 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドを対象とすることを特徴とする抗体または抗体フラグメント。
12. 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の核酸または対応する m R N A にハイブリダイズし得るヌクレオチドプローブ。

13. 請求項1から6のいずれか一項に記載のペプチドまたは請求項1-1に記載の抗体もしくは抗体フラグメントまたは請求項7から9のいずれか一項に記載のスクレオチド配列の少なくとも1つを有効成分として含む医薬組成物。

14. 請求項7または8に記載のスクレオチド配列が組込まれたウイルス性または非ウイルス性の組換えベクターを含むことを特徴とする請求項13に記載の医薬組成物。

15. ベクターがレトロウイルス及びアデノウイルスから選択されたウイルスベクターであることを特徴とする請求項14に記載の医薬組成物。

16. FE65タンパク質とAPPの細胞質領域との相互作用を変調するために使用されることを特徴とする請求項13から15のいずれか一項に記載の医薬組成物。

17. FE65タンパク質とAPPの細胞質領域との相互作用のレベルに干渉するために使用されることを特徴とする請求項16に記載の医薬組成物。

18. 神経変性疾患を治療するために使用されることを特徴とする請求項16に記載の医薬組成物。

19. 神経変性疾患の型別を判定するための請求項11に記載の抗体または抗体フラグメント及び/または請求項7または8に記載のスクレオチド配列の使用。

20. 請求項7または8に記載のスクレオチド配列を含む細胞を前記配列の発現条件下で培養し、產生されたペプチドを回収

することを特徴とする請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドの製造方法。

21. 請求項1から5のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするヘテロガス核酸配列を含む欠陥組換えベクター。

【発明の詳細な説明】

APPのエンドサイトーシスを阻害し得るペプチド及び対応するヌクレオチド配列

本発明は、新規なペプチド及びヌクレオチド配列とそれらの医薬的使用に関する。より特定的には本発明は、APPのエンドサイトーシス現象を少なくとも部分的に阻害し得る新規なペプチドに関する。

アミロイド斑の主要な構成成分であるアミロイド β ペプチドは、APP（アミロイド前駆ペプチド）の開裂によって生成され、約40個のアミノ酸から成る4kDaのペプチドである。このペプチドはアルツハイマー病及びトリソミー21症候群という通称のダウン症候群の患者の脳に大量に蓄積される。

APPはトランスメンブラン領域、細胞外ドメイン及び細胞質ドメインを含む複数のドメインを有する100～140kDaの糖タンパク質である。アミロイド β ペプチド発現に特に関与する分子の領域はトランスメンブランドメインに部分的にオーバーラップし、また細胞外ドメインの内部に伸びている。APPは選択的スプライシングによ

って主として3つの形態で形成され、これらの形態は特性決定されている。APPの遺伝子は染色体21に局在し、家族性形態のアルツハイマー病患者の3～5%で染色体21の突然変異が同定されている。

APPの生理学的作用は現状ではまだ完全には解明されていない。しかしながら、APPはシナプス接触に関与し、成長調節因子として作用し、ニューロン保護作用を有すると考えられている。

最近の文献のデータは、APPのエンドサイトーシスがアミロイド β ペプチドの产生に重要な役割を果たすこと、及び、エンドサイトーシスシグナルとして使用される配列要素が細胞質領域の内部で同定されたことを示している。例えば、APPのサイトゾルのC末端ドメインの欠失したcDNAの構築物がトランスクレクトされた細胞は、可溶性形態のAPPを产生することはできるが、アミロイド β ペプチドを产生することはできない。しかしながら、APPのエンドサイトーシスの活性化とエンドサイトーシス関連シグナルの形質導入とを生じさせる i

n vivo イベントは未だ詳細には解明されていない。

従って、アルツハイマー病及びより普遍的な神経変性疾患を理解しその治療方法を開発するためには、細胞内のエンドサイトーシスに関連する上記シグナルの正確な役割、それらの作用方法及び特性を解明することが最も重要である。

出願人は、F E 6 5 タンパク質が、脳内で転写活性タンパク質として作用するだけでなく、A P P の細胞質領域レベルにも相互作用してA P P のエンドサイトーシスの調節に干渉することを知見し、本発明に到達した。

より特定的には本発明は、A P P のエンドサイトーシスの活性化シグナルの形質導入に関与するF E 6 5 タンパク質の特定領域（いわゆるエフェクター領域）の同定及びキャラクタリゼーションに基づく。このような領域の存在が証明されたので、医薬として有用な新規なペプチドの製造が実現可能になったのである。

本文中で使用した“F E 6 5 タンパク質”なる用語は、F E 6 5 タンパク質自体及びそのすべての相同形態を含む。“相同形態”なる用語は、種々の細胞、特にヒトまたは他の生物の細胞に由来するタンパク質であって、F E 6 5 タンパク質と同じタイプの活性を有しているF E 6 5 タンパク質に等価のすべて

のタンパク質を意味する。このような相同配列はハイブリダイゼーション実験によって得られる。ここで“等価の”と呼ばれるタンパク質は、請求の範囲に記載のF E 6 5 タンパク質と同等の生理的挙動を示すタンパク質を意味しており、同等の生理的挙動を示すために有効な値の相同性（%）を有していればよい。

従って、本発明の第一の目的は、F E 6 5 タンパク質またはその相同形態の1つとA P P の細胞質領域との相互作用レベルに少なくとも部分的に干渉し得るペプチドを提供することである。

本発明のペプチドによるこのような干渉は種々の形態で出現し得る。本発明のペプチドは、F E 6 5 タンパク質またはその相同形態の1つとA P P の細胞質領域との相互作用を少なくとも部分的に低減、阻害または刺激し得る。このような相互作用に少なくとも部分的に拮抗し得るペプチドが好ましい。

本発明の特定実施態様によれば、ペプチドはF E 6 5 タンパク質またはその相

同形態の 1 つと A P P の細胞質領域との相互作用 ドメインのレベルに関与し得る。

より好ましくは、本発明のペプチドは、配列 1、配列 2 また

はその誘導体の 1 つに存在する F E 6 5 タンパクをコードするペプチド配列の全部または一部を含む。

本発明で使用された“誘導体”なる用語は、1 つまたは複数の遺伝的特性及び／または化学的特性の修飾によって遺伝コードが変性され、本発明の配列とは異なる配列をもつすべての配列を意味する。“誘導体”なる用語はまた、これらの配列またはそのフラグメントとハイブリダイズする配列であって F E 6 5 タンパク質またはその相同形態の 1 つと A P P の細胞質領域との相互作用レベルに作用する能力を維持しているすべての配列を意味する。“遺伝的特性及び／または化学的特性の修飾”なる用語は、1 つまたは複数の残基の突然変異、置換、欠失、付加及び／または修飾を意味する。“誘導体”なる用語はまた、他の細胞ソースに由来する配列、特にヒトまたは他の生物の細胞に由来する配列であって、本発明の配列と同じタイプの活性を有している本発明の配列に相同の配列を含む。このような相同配列は、ハイブリダイゼーション実験によって得られる。ハイブリダイゼーションは、核酸バンクを出発材料とし、天然型 (n a t i v e) 配列またはそのフラグメントをプローブとして用い、種々のハイブリダイゼーション条件で行

う(分子生物学の汎用技術に関しては、M a n i a t i s ら、参照)。

このような誘導体は種々の目的、特に、治療効率の向上、副作用の抑制、または、薬剤動態学的及び／または生物学的な新規な特性の付与、などの目的で製造される。

F E 6 5 タンパク質及びその相同形態に由来のペプチドとしては特に、A P P の細胞質領域と相互作用する能力を有しているか非機能のエフェクター領域を有しているペプチドがある。このようなペプチドは、F E 6 5 タンパク質及びその相同形態のエフェクター領域の欠失、突然変異または破壊によって得られる。こ

のような修飾は例えば、in vitro突然変異誘発、付加要素もしくは合成配列の導入、または、初期要素の欠失もしくは置換によって得られる。このようにして得られた誘導体は、FE 6 5タンパク質及びその相同形態がAPP結合部位に結合することを部分的に阻害する活性を有することが証明されている。勿論、このために当業者に公知のいかなる技術を使用してもよい。

本発明のペプチドはまた、上記に定義の配列のフラグメントであってもよい。このようなフラグメントは種々の方法で作製

できる。特に、当業者に公知のペプチドシンセサイザーを使用し本発明の配列に基づいて化学的方法で合成できる。また、所望のペプチドをコードするヌクレオチド配列を細胞宿主中で発現させる遺伝的方法で合成できる。このヌクレオチド配列は、本発明のペプチド配列及び遺伝コードに基づいてオリゴヌクレオチドシンセサイザーを使用して化学的に合成できる。このヌクレオチド配列はまた、当業者に公知の技術を用いて本発明の配列を酵素的切断、結合、クローニングなどで処理することによって作製することもでき、または、本発明の配列から作製したプローブでDNAバンクをスクリーニングすることによって作製することもできる。

更に、本発明のペプチド、即ち、FE 6 5タンパク質及びその相同形態とAPPの細胞質領域との相互作用を少なくとも部分的に低減または阻害し得るペプチドはまた、該ペプチドの配列がFE 6 5タンパク質及びその相同形態の配列中のAPPの細胞質領域に相互作用する部位の配列に一致するようなペプチドであってもよい。

また、上記に定義のペプチドと競合的に標的細胞に相互作用し得るペプチドも本発明に包含される。本発明のペプチドの配

列に基づいてこのようなペプチドを合成し、得られたペプチドと上記に定義のペプチドとの競合能力を測定する。

本発明の別の目的は、上記に定義のペプチドに対するポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体またはこれらの抗体のフラグメントを提供することであ

る。このような抗体は当業者に公知の方法によって得られる。特に、動物を本発明のペプチドで免疫感作し、血液を採取し、抗体を単離することによって目的の抗体が得られる。また、当業者に公知の技術でハイブリドーマを調製することによって目的の抗体が得られる。

より好ましくは、本発明の抗体または抗体フラグメントは、本発明のペプチドとAPPの細胞質領域との相互作用を少なくとも部分的に阻害する能力を有している。従って、これらの抗体または抗体フラグメントは、APPのエンドサイトーシスを変調するために使用できる。

更に、これらの抗体はまた、生物サンプル中のAPPの発現または超発現を検出及び／または定量するために使用でき、その結果としてAPPの活性化状態に関する情報を得るために使用できる。

本発明はまた、医薬として有用な非ペプチド化合物または非ペプチド単独化合物を提供する。実際、本発明に記載の活性タンパク質モチーフに基づいて、医薬用途に適性の非ペプチド単独化合物を、FE65タンパク質依存性シグナル伝達経路の阻害分子として作製し得る。

本発明の目的はまた、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列を提供することである。特に、配列1、配列2またはそれらの誘導配列の1つに存在する配列の全部または一部を含む配列を提供する。本文中で使用された“誘導配列”なる用語は、配列1または配列2またはそれらのフラグメントとハイブリダイズしており本発明のペプチドをコードしている配列、及び、これらの配列から遺伝コードの変性によって得られた配列を意味する。本発明の種々のヌクレオチド配列は人工配列でもよくそうでなくてもよい。配列はゲノム配列、cDNA配列、RNA配列、ハイブリッド配列、合成配列、半合成配列のいずれでもよい。これらの配列は、DNAバンク（cDNAバンク、ゲノムDNAバンク）のスクリーニング、化学的合成、バンクスクリーニングによって得られた配列の化学的または酵素的修飾を含む混成方法、などによって得られる。

このようなヌクレオチド配列は本発明のペプチドを産生させ

るために使用できる。従って本発明はまた、本発明のヌクレオチド配列を含む細胞を該配列の発現条件下で培養し、產生されたペプチドを回収するペプチドの製造方法を提供する。この方法では一般に、ペプチドをコードする部分が宿主細胞中で該ペプチドを発現させるシグナルのコントロール下に配置される。これらのシグナル（プロモーター、ターミネーター、分泌“リーダー”配列、など）の選択は、使用される宿主細胞次第で異なっている。更に、本発明のヌクレオチド配列が、自律複製型ベクターまたは一体型ベクターの構成要素となつてもよい。自律複製型ベクターは例えれば、選択された宿主細胞の自律複製配列を利用することによって得られる。一体型ベクターは例えれば、宿主のゲノムのいくつかの領域の相同配列を利用し、相同組換えによってベクターを組込むことによって得られる。

組換え法によって本発明のペプチドを產生するために使用される宿主細胞は真核細胞でもよく原核細胞でもよい。適當な真核細胞宿主としては、動物細胞、酵母または菌類がある。酵母としては特に、*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*

または*Hansenula*がある。動物細胞としては、COS、CHO、C127などの細胞がある。菌類細胞としては特に、*Aspergillus*種または*Trichoderma*種がある。原核細胞宿主としては*E. coli*、*Bacillus*または*Streptomyces*のような細菌の使用が好ましい。

本発明の核酸配列はまた、医薬として有用なアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンス遺伝子配列の作製に使用できる。アンチセンス配列は、所与の遺伝子のコーディング鎖に相補的であり従って転写されたmRNAと特異的にハイブリダイズできその結果として該mRNAがタンパク質に翻訳されることを阻害する短いオリゴヌクレオチドである。従って、APPの細胞質領域とFE65タンパク質との相互作用を少なくとも部分的に阻害し得るアンチセンス配列を提供することも本発明の目的である。このような配列は上記に定義の核酸配列の全部または一部から成る。一般には、APPの細胞質領域と相互作用するペプチドをコードする配列の相補的配列またはそのフラグメントから成る。このような

オリゴヌクレオチドは例えば、断片化などの方法または化学合成によ

って得られる。

本発明の配列は遺伝子治療の分野で、APPの細胞質領域とFE65タンパク質との相互作用を変調し得るアンチセンス配列またはペプチドを in vivo で導入するかまたは発現させるために使用され得る。このために in vivo 投与が可能なウイルス性または非ウイルス性のベクターに配列を組込む (Medecine et Sciences 7 (1991) 705)。本発明に好適なウイルスベクターとしては特に、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ関連ウイルスまたはヘルペスウイルス型のベクターがある。本発明の目的はまた、本発明のポリペプチドをコードするヘテロロガス核酸配列を含む欠陥組換えウイルスを提供することである。

本発明はまた、上記に定義のヌクレオチド配列とハイブリダイズでき遺伝子治療の分野で有用な合成または非合成のヌクレオチドプローブを提供し得る。このようなプローブは、APPの発現または超発現を検出するため、あるいは、遺伝的異常（誤ったスプライシング、多形性、点突然変異、など）を検出するための in vitro 診断ツールとして使用され得る。これらのプローブはまた、別の細胞ソース及び好ましくはヒト起原

の細胞から上記に定義のペプチドをコードするホモロガス核酸配列を検出及び単離するために使用され得る。本発明のプローブは一般に、少なくとも 10 個の塩基を含み、例えば上記配列の 1つまたはその相補鎖全部を含み得る。好ましくはこれらのプローブを使用に先立って標識する。このために、当業者に公知の種々の技術（放射性標識、酵素標識、など）を使用し得る。

本発明の目的は更に、少なくとも 1つの上記に定義のペプチドを有効成分として含む医薬組成物を提供することである。

本発明の目的はまた、少なくとも 1つの上記に定義の抗体及び/または抗体フラグメントを有効成分として含む医薬組成物並びに、少なくとも 1つの上記に定義のヌクレオチド配列を有効成分として含む医薬組成物を提供することである。

更に、本発明の目的はまた、上記に定義のペプチド、抗体及びヌクレオチド配列が互いにまたは別の有効成分と共に存している医薬組成物を提供することである。

本発明の医薬組成物の使用目的は、APPタンパク質の活性化を変調し、その結果としてそのエンドサイトーシスを変調しアミロイド β ペプチドの産生を変調することである。より特定的にはこれらの医薬組成物は、FE65タンパク質とAPPの

細胞質領域との相互作用を変調する。より好ましくはこれらの医薬組成物は、FE65タンパク質とAPPの細胞質領域との相互作用を少なくとも部分的に低減または阻害する。より好ましくはこれらの医薬組成物は、例えばアルツハイマー病及びトリソミー21症候群のような神経変性疾患を治療する。

本発明の目的は更に、APPのエンドサイトーシスの活性化を変調するためまたは神経変性疾患の型別を判定するために上記に記載の分子を使用することである。本発明は特に、APPのエンドサイトーシスの活性化を少なくとも部分的に阻害するためのこれらの分子の使用に関する。

本発明の別の利点は、本発明の非限定的代表例である以下の記載及び実施例から明らかにされるであろう。

図面の簡単な説明

図1は、ベクターpGAL4DB-CAPPの構造を表す。

図2は、実施例3で得られたゲル上のプラスミドDNAを表す。

図3は、異なる起源のFE65のヌクレオチドフラグメントの比較を示す。

使用した材料及び方法

(1) 使用した酵母菌株 :

S. cerevisiae 属の YCM 株 (MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, canr, gal4-542, gal180-538, URA3::GAL1/10-lacZ, LYS::GAL1/10-HIS3) は、2

ハイブリッド系による脳の融合バンクのスクリーニングツールとして使用した。

S. cerevisiae 属の L40 株 (Mata, his3D200, trp1-901, leu2-3, 112, ade2, LYS2::(lexAop)4-HIS3, URA3::(lexAop)8-LacZ, GAL4) は、一方のタンパク質が LexA タンパク質から成る融合タンパク質が形成されるときのタンパク質-タンパク質相互作用を確認するために使用した。LexA タンパク質は、リポーター遺伝子 LacZ 及び HIS3 の発現をコントロールする応答要素 LexA を認識し得る。

これらの細胞を以下の培養培地で培養した。

YPD 完全培地 :

一酵母抽出物 (10 g/リットル) (Difco);

一バクトペプトン (20 g/リットル) (Difco);

一グルコース (20 g/リットル) (Merck)。

この培地に 20 g/リットルの寒天 (Difco) を加えて固体培地とした。

YNB 最小培地 :

一酵母窒素塩基 (アミノ酸非含有) (6.7 g/リットル) (Difco);

一グルコース (20 g/リットル) (Merck)。

この培地に 20 g/リットルの寒天 (Difco) を加えて固体培地とした。

酵母の栄養要求株がこの培地で増殖できるためには、培地にアミノ酸または該アミノ酸を与える窒素含有塩基を 50 mg/m1 で添加する必要がある。細菌汚染を防止するために培地に 100 μg/m1 のアンピシリンを加える。

(2) 使用した細菌株 :

遺伝子型 supE, hsd△5, thi, △(lac-proAB), F' [tr�36 pro A+B+lacI q lacZ△M15] の大腸菌 TG1 株。使用した組換えプラスミドの増幅及び単離手段としてこの菌株を使用した。

この菌株を以下の培地で培養した。

LB 培地 :

—N a C l (5 g／リットル) (D i f c o);

—バクトラリプトン (10 g／リットル) (D i f c o);

—酵母抽出物 (5 g／リットル) (D i f c o)。

この培地に20 g／リットルの寒天 (D i f c o) を加えて固体培地とした。

アンピシリンは、アンピシリン耐性遺伝子を含むプラスミドを受容した細菌を選択するためにマーカーとして使用できるので、100 μ g／ml のアンピシリンを加えた。

(3) 使用したプラスミド:

ベクターpGBT10 (C l o n t e c h) は、細菌及び酵母の複製起点を有している5.4 kbのシャトルプラスミドであり、細菌及び酵母の双方の体内で高いコピー数で複製され得る。このプラスミドは、融合タンパク質を形成するためにGAL4のDNA結合ドメインをコードする配列の下流でターミネーターの上流に存在する多重クローニング部位を含む。このプラスミドはまた、トリプトファン非含有の最小培地でtrp1遺伝子型の酵母を選択するために該遺伝子型を相補し得るS. sevisiaeのTRP1遺伝子を含む。このベクターは、アンピシリン含有培地でアンピシリン耐性遺伝子を有する細菌が選択

されるようにアンピシリン耐性遺伝子を含んでいる。

ベクターpGAD110は、C l o n t e c hから提供されるベクターであり、GAL4のトランス作用転写活性ドメインとE c o R I部位に挿入された脳バソク由来のc DNAでコードされたタンパク質との融合タンパク質を酵母の体内で発現させ得る。

ベクターpLex9 (pBTM116) (B a r t e l l a, D. A. H a r t l e y Ed, O x f o r d U n i v e r s i t y p r e s s, 1 5 3 頁) は、pGBT10に相同的の5 kbのベクターであり、融合タンパク質を形成するために細菌リプレッサーL e x Aをコードする配列の下流でターミネーターの上流に存在する多重クローニング部位を含む。

(4) 使用した合成オリゴヌクレオチド:

CAA GTC GAC CTA GTT CTG CATCTG CTC(配列3);

CAA GAA TTC AAG AAA CAG TACACA TCC(配列4)。

これらのオリゴヌクレオチドから、EcoRI部位及びSaiI部位をもつCAPPに対応するPCRフラグメントが得ら

れた。

Applied System ABI 394-08でオリゴヌクレオチドを合成する。オリゴヌクレオチドをアンモニアによって合成マトリックスから分離し、10倍量のn-ブタノールによって2回沈殿させ、次いで水に戻す。光学密度の測定によって定量する(1ODは30 μ g/mlに相当する)。

(5) プラスミドDNAの調製:

大量のDNAはPromegaの高速DNA調製キットを使用して調製する。

少量のDNAは以下の手順で調装する。プラスミドを含む細菌を2mlのLB培地に入れ、攪拌振盪装置内で少なくとも4時間培養する。次いで細菌をエッペンドルフ管で14,000 rpmで2分間遠心し、沈渣を100 μ lの溶液I(50mMのグルコース、25mMのトリス-HClバッファ、pH8、10mMのEDTA、pH8)に再度懸濁させ、200 μ lの溶液II(0.2MのNaOH、1%のSDS)によって溶菌する。溶菌液を次に、150 μ lの溶液II(3Mの酢酸カリウム、11.5%(v/v)の氷酢酸)で中和する。フレーク状沈殿物が得られるまで管を攪拌した後、150 μ lのフェ

ノール/クロロホルム混合物(水中に飽和した50%フェノールと50%クロロホルム)を添加し、全体を30秒間攪拌する。14,000 rpmで2分間遠心後、DNAを含有する水相を回収する。次に、0.5倍量のイソプロパノールを添加して沈殿させ、次いで14,000 rpmで5分間遠心し、風乾し、最後に20 μ lのTE RNアーゼ(50 μ g/mlのRNアーゼを含む10mMのトリス-HClと1mMのEDTAの溶液)に戻す。

(6) DNAの酵素的増幅またはPCR(ポリメラーゼ連鎖反応):

DNAマトリックス、dNTP(0.2 mM)、PCRバッファ(10 mMのトリス-HCl, pH 8.5、1 mMのMgCl₂、5 mMのKCl、0.01%のゼラチン)、0.5 μgの各オリゴヌクレオチド及び2.5 IUのAmp 1 i

Taq DNAポリメラーゼ(Perkin Elmer)の存在下、ホルムアミド(5%)添加または非添加で、最終容量100 μlでPCR反応を行う。サンプルの蒸発を防ぐために混合物を2滴のパラフィン油で被覆する。使用した装置はAppligeneの“Crocodile II”である。マトリックス

の変性温度として90°C、オリゴヌクレオチドとマトリックスとのハイブリダイゼーション温度としてはオリゴヌクレオチドの分離温度よりも5~10°C低い温度、酵素による伸長温度として72°Cを使用した。

(7) 結合:

すべての結合反応は、100~200 ngのベクター、0.5~2 μgのインサート、40 IUの酵素T4 DNAリガーゼ(Biologics)及び結合バッファ(50 mMのトリス-HCl, pH 7.8; 10 mMのMgCl₂; 10 mMのDTT; 1 mMのATP)の存在下、最終容量10 μlで+14°Cで一夜処理することによって行う。陰性対照として、インサート非存在のベクターを結合処理する。

(8) プラスミドによる細菌の形質転換プロトコル:

結合反応物全量(10 μl)を用いて、Chungら(PNAS, 1988 86, 2172~2175)の方法によってコンピテントにした細菌TG1を形質転換させる。液体LB培地中の細菌TG1を攪拌器付きインキュベーターで600 nmのODが0.6になるまで37°Cで数時間培養する。次いで培

地を6,000 rpmで10分間遠心する。出発培養培地の十分の一の量に対応する量のTSB(LB培地+100 g/リットルのPEG 4, 000, 5%のDMSO, 10 mMのMgCl₂, 10 mMのMgSO₄)に細菌沈渣を戻すことによってコンピテント細菌を得る。4°Cで30~60分間のインキュベーション

後、 $200\mu l$ の細菌を結合産物に氷土で 15 分間接触させる。 $200\mu l$ の L B を添加した後、細菌を 37°C で 30 分間インキュベートし、次いで L B 培地 + アンピシリンで平板培養する。

(9) DNAの分離及び抽出手順：

電気泳動法を用いDNAをサイズに基づいて分離する。このために、分離すべきフラグメントのサイズに応じて種々のゲルを使用する。

—DNAの小フラグメント ($75\sim500\text{ bp}$) の分離には 6%、10% 及び 20% のプレキャストポリアクリルアミドゲル (Novex)、

—DNAの大フラグメント (500 bp 以上) の分離には TBE バッファ (90 mM のトリス塩基; 90 mM のホウ酸塩; 2 mM のEDTA) 中の 1% アガ

ロースゲル (Gibco BRL)、

—小フラグメント (500 bp 以下) の分離には TBE バッファ中の 2% Nu Sieve アガロースゲル (FMC Bioproducts)。

アガロースゲル及びポリアクリルアミドゲルのいずれの場合にも電気泳動は TBE バッファ中、分子量マーカー (1 Kb の ladder, Gibco BRL) の存在下で行う。DNAをゲルに配置する前に、DNAを十分の一の量のデボープルー ($200\text{ g}/\text{リットル}$ のフィコール、 $0.5\text{ g}/\text{リットル}$ のプロモフェノールフルーレ、 50 mM のEDTA) と混合する。100ボルトで泳動させ、臭化エチジウム (ゲル 1 ml あたり $0.5\mu\text{g}$ の濃度) で染色した後、UVランプでバンドを可視化する。

アガロースゲルのバンドからDNAを抽出するために以下の手順の電気溶出を行う。即ち、DNAフラグメントを含むゲル切片をメスで裁断し、 $100\sim500\mu l$ のTBEを収容した透析バッグに入れ、2個のクリップで閉鎖する。全体を電気泳動槽に入れ、100ボルトの電界を作用させる。ゲルから取り出したDNAを次に、フェノール/クロロホルムで2回抽出し、

次いでクロロホルムで2回抽出することによって精製し、 0.3 M の酢酸ナトリウムと 2.5 倍量の無水エタノールとの存在下で沈殿させる。遠心後 ($14,000\times g$ で 15 分間) で上清を吸引し、沈殿を吸着紙上に残す。

0 0 r p mで5分間)、DNA沈渣を乾燥し、20 μ lの水に戻す。

(10) 蛍光法によるプラスミドDNAの配列決定

異なる蛍光マーカーを有する4つのジデオキシリボヌクレオチドを用い、Sanger法に従って配列決定を行う。いずれか1つのジデオキシリボヌクレオチドが取り込まれると、配列決定すべきDNAのTaqポリメラーゼによる複製が停止する。この反応によって種々のサイズのDNAが得られる。どのDNAも、4つのジデオキシリボヌクレオチドのいずれか1つから成る3'末端を有している。1 μ gのプラスミドと4ピコモルのプライマーとを、Applied BiosystemsからPrism(登録商標)として販売されている9.5 μ lの“プレミックス”に添加する。96°Cで30秒間の変性段階と50°Cで15秒間のハイブリダイゼーション段階と60°Cで4分間の伸長段階とから成るサイクルを25回繰返すことによってPCRを行うために20 μ lの最終容量が必要である。

增幅後に得られたDNAフラグメントを、排除カラム (ClontechのChromaspin-30) で精製し、次いでSpeed Vacで乾燥する。全部のフラグメントを、24 μ lのEDTA (50 mM) と120 μ lの脱イオン化したホルムアミドとから成る混合物5 μ lに戻す。96°Cで3分間変性した後、3~5 μ lを電気泳動ゲルに配置する。種々のDNAフラグメントをサイズに従って分離し、順次にApplied 370 DNAシークエンサー (Applied Biosystems) のレーザー読取装置に通し、種々の蛍光を検出する。

(11) 脳バンク (Clontech(登録商標)) のプラスミドの調製:

脳のcDNAの融合バンクは細菌の形態で販売されている。これらの細菌は、ヒト脳のcDNAに対応するインサートを含むプラスミドpGAD10を含有している。このバンクのcDNAは、オリゴdTの技術及び変性オリゴヌクレオチドの技術によって得られる。後者の技術を用いると、オリゴdTの技術によって得ることが難しいmRNAの5'部分が得られる。これらのcDNAはベクターpGAD10のEcoR

I 部位のレベルにクローニングされている。

脳の融合バンクの名称を確認し、バンクの $2\ \mu\text{l}$ の細菌を $8\text{m}\text{l}$ のLB培地に予め導入し、バンクとしての適格性を維持するように固体培地で非集密的に平板培養する。即ち、LB培地+アンピシリンを入れた 770cm^2 容の16個の容器で平板培養した。出現したコロニーを各容器あたり $30\text{m}\text{l}$ の液体LB培地+アンピシリンに戻す。次に、得られた懸濁液を三角フラスコ(Erlen)に入れ、振盪装置内で 37°C で3時間インキュベートする。次にマキシプレップ(Maxi prep)の技術によってこれらの菌株からDNAを抽出する。DNAの濃度を 260nm で測定する。

(12) プラスミドによる酵母の形質転換:

$100\text{m}\text{l}$ の液体培地で予め培養した酵母を、 $3,000\text{rpm}$ で3分間遠心後に採取し、 $1\text{m}\text{l}$ の無菌水に懸濁させる。 $3,000\text{rpm}$ で3分間遠心した後、細胞沈渣を再度 $1\text{m}\text{l}$ の無菌水に懸濁させ、次いで再度遠心する。培養培地を痕跡量まで除去するためにこの処理をもう一度繰返す。次に、酵母を $1\text{m}\text{l}$ の形質転換溶液I(0.1M のLiAc、 10mM のトリス-HCl, pH 7.

5、 1mM のEDTA)に戻し、 $3,000\text{rpm}$ で3分間遠心する。細胞沈渣を再度 $1\text{m}\text{l}$ の形質転換溶液Iに戻す。 $50\mu\text{l}$ のこの酵母懸濁液を $50\mu\text{g}$ のサケ精子DNA及び $1\sim5\mu\text{g}$ のプラスミドDNAに接触させる。次に、 $300\mu\text{l}$ の形質転換溶液II(40%のPEG 4000中の 0.1M のLiAc、 10mM のトリス-HCl, pH 7.5、 1mM のEDTA)を添加し、次いで全体を 28°C で30分間インキュベートする。次に、形質転換混合物に 40°C の湯煎で熱ショックを15分間作用させ、次いで全体を $15,000\text{rpm}$ で1分間遠心して細胞沈渣を回収する。この沈渣を $200\mu\text{l}$ の水に戻し、次いで形質転換プラスミドに含まれるマーカー-アミノ酸を含まないゲル化最小培地で平板培養する。次に、酵母を 28°C で72時間培養する。

脳cDNAバンクによって酵母を形質転換させるための処理手順:

使用した酵母は、APPのC末端部分をコードするCAPPがGAL4のDNA結合ドメインに融合したプラスミドpGAL4DB-CAPPを含む。この酵

母を250mlのYNB+His+Lys+Ad+Leu最小培地中、攪拌下、28°Cで、

107細胞/mlの密度まで培養する。細胞を3,000rpmで10分間遠心することによって回収し、250mlの水に戻す。再度遠心した後、細胞沈渣を100mlの水に戻し、遠心を繰返す。次に、沈渣を10mlの形質転換溶液Iに戻し、攪拌下に28°Cで1時間インキュベートする。遠心後、細胞を2.5mlの形質転換溶液I、100μlの脳cDNAバンク、20mlの形質転換溶液IIに混合し、次いで攪拌下に28°Cで1時間インキュベートする。この形質転換混合物に42°Cで20分間の熱ショックを与える。遠心(3,000rpmで5分間)を3回連続して繰返す。一回の遠心毎に、沈渣を10mlの無菌水に戻す。3回目の沈渣を2.5mlのPBSに戻す。このようにして細胞毒性PEGを除去した。得られた懸濁液の2.4mlをアミノ酸His、Lys、Adを含有する250mlの最小培地に播種するために使用し、28°Cの振盪装置で一夜培養する。残りの懸濁液の100μlを形質転換効率の測定に使用する。測定のために、懸濁液を10⁻²、10⁻³及び10⁻⁴に希釈し、アミノ酸His、Lys、Adを含有する最小培地で平板培養した。28°Cで2日間培養した後に得られたコロニーをカウントした。“コ

ロニー数×希釈度”の式を用いて形質転換率を算出する。一夜培養物を遠心し(3,000rpmで5分間)、無菌水で連続2回洗浄する。次に、沈渣を2.5mlの水に戻す。2.4mlを無菌水で10mlにし、YNB+Lys+Ad培地を入れた435cm²容の10個の容器に播種し、3日間インキュベートする。残りの100μlを形質転換率の測定に使用した場合と同様に処理し、一夜培養によるコロニー数の増幅率を測定する。

酵母からDNA(ゲノム及びプラスミド)を抽出するための処理手順:

3gの450μm径のガラスピース及び200μlのフェノール/クロロホルムの存在下、200μlのTEL溶液(2%のトリトンX100、1%のSDS、100mMのNaCl、10mMのトリス、pH8、1mMのEDTA)に

、平均的な長さの酵母クローンを導入する。この混合物を渦流によって15分間攪拌し、次いで14,000 rpmで2分間遠心する。上清に含まれているタンパク質フレーク及びDNAを除去しないで上清を収集し、2.5倍量の無水エタノールで沈殿させる。14,000 rpmで2分間遠心した後、DNA沈渣を乾燥し、

20 μlのTE RNアーゼに戻す。このDNA溶液はゲノムDNAとプラスミドDNAとの混合物であり、細菌を形質転換するために直接使用できる。プラスミドDNAだけが細菌中で複製され、ミニプレップの技術で分析され得る。

(13) β ガラクトシダーゼの活性試験：

単離した酵母クローンを入れるシャーレにニトロセルロースシートを予め敷込む。クローンの位置が吸着現象によって正確に転写される。次に、ニトロセルロースシートを液体窒素に30秒間浸漬させて酵母を破裂させ、 β ガラクトシダーゼ活性を遊離させる。解凍後、コロニー担持面を上にしたニトロセルロースシートを、1.5 mlのPBS溶液 (60 mMのNa₂HPO₄、40 mMのNa₂H₂PO₄、10 mMのKCl、1 mMのMgSO₄, pH 7) とN, N-ジチメルホルムアミド中に50 mg/mlの濃度で含まれる10~30 μlのX-Ga1 (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイル- β -D-ガラクトシド) とを予め含浸させたワットマンペーパーを敷いた別のシャーレに配置する。次いでシャーレを37℃のインキュベータに入れ、乾燥しないように蓋を閉じる。青色が呈示されるまでの所要時間には極めてばらつきがあり、数分間から数時間の範囲にわたる。この試験は必ず、相互作用が認識されており迅速に青色を呈示する陽性对照の存在下で行う必要がある。

実施例1：アミロイド前駆ペプチドのC末端部分(CAPP)とGAL4のDNA△結合ドメインとの融合タンパク質を発現させ得るベクターの構築

ダブルハイブリッド系を用いるパンクをスクリーニングするためには、APPのC末端領域(CAPP)をトランス作用転写活性タンパク質GAL4のDNA

結合ドメインに融合させる必要がある。この融合タンパク質を発現させるために、ベクター p G B T 1 0 (マトリックス及び方法参照) を使用し、このベクターに、配列 1 で示した配列中に存在する C A P P をコードする配列を、G A L 4 (G A L 4 D B) のDNA結合ドメインに対応する配列と同じ読み取り枠で導入した。

APP の最終 4 6 個のアミノ酸に対応する 1 3 8 b p のDNAフラグメント配列は、末端に E c o R I 部位及び S a 1 I 部位を導入したオリゴヌクレオチド (配列 3 及び配列 4) の P C R によって得られた。G A L 4 D B に対応する配列の下流でプラスミド p G B T 1 0 の多重クローニング部位の E c o R I 部位と S a 1 I 部位との間に P C R フラグメントを導入し、ベクター p G A L 4 D B - C A P P (図 1) を形成した。

所望の構築物が得られたか否かをDNAの配列決定によって確認した。この配列決定によって、得られたフラグメントが P C R 反応中に生じた突然変異を有していないこと、及び、このフラグメントが G A L 4 D B に対応するフラグメントと同じ読み取り枠に融合したことが確認された。

実施例 2 : 脳融合バンクのスクリーニング

融合バンクのスクリーニングによって、本発明の有益なタンパク質と相互作用し得る G A L 4 のトランス作用転写活性ドメインに融合したタンパク質を産生するクローランを同定し得る。この相互作用は、Y C M 菌株中のリポーター遺伝子 H i s 3 及び L a c Z の発現を誘発できるようにトランス作用因子を再構成する。

スクリーニングを行うために、ヒト脳由来の c D N A から得られた融合バンクを選択した。このバンクは細菌の形態で提供されたので、バンクから先ずプラスミド D N A を精製した。

(2. 1) 融合バンクのプラスミド D N A の調製 :

脳 c D N A バンクのプラスミド D N A を C l o n t e c h (登録商標) プロトコル (材料及び方法の項 1 1 参照) によって抽出した。この調製中には、バンクとしての適合性を維持す

ること、即ち、バンクを構成する独立プラスミドの数を $1 \cdot 2 \times 10^6$ に維持することが重要であった。調製中のバンクのプラスミドの損失を配慮して、バンクとしての適合性を維持するコロニー数のほぼ2倍、即ち 4×10^6 コロニーに対応する数の単離細菌コロニーから得られたプラスミドDNAのロットを構築した。

(2. 2) 脳バンクによる形質転換及びβガラクトシダーゼ活性試験による選択

スクリーニングのときには、融合バンクの各独立プラスミドが少なくとも1つの酵母体内でプラスミドpGAL4DB-CAPPと確実に共存していなければならぬ。このような共存を確実にするためには、酵母を十分な効率で形質転換する必要がある。従って、酵母の形質転換のために、DNA $1 \mu g$ あたり 10^5 の形質転換細胞という効率が得られるような形質転換プロトコルを選択した。更に、異なる2つのプラスミドによる酵母の同時形質転換は形質転換効率を低下させるので、使用する酵母をプラスミドpGAL4DB-CAPPによって予め形質転換しておくのが好ましい。表現型His-、Lys-、Leu-のYCM-CAPP菌株を、融合バンクの1

$0.0 \mu g$ のプラスミドDNAによって形質転換した。この量のDNAから算定すると(材料及び方法参照)、 10^7 個の形質転換細胞が得られた。これはバンクを構成する独立プラスミドの数よりもやや多い数である。この結果から、バンクのプラスミドのほぼ全部が酵母の形質転換に使用されたと考えることができる。機能性のGAL4トランスクレオチド作用因子を再構成し得る形質転換細胞をYNB+Lys+Ade培地で選択した。

この選択によって、表現型His+をもつ $1,000$ 個のクローンが得られた。得られたクローンの数が有効であることを別のリポーター遺伝子lacZの発現によって確認するためにこれらの形質転換体のβガラクトシダーゼ活性を試験した。得られた $1,000$ 個のクローンのうちの 68 個のクローンが、タンパク質-タンパク質相互作用に対応し得るダブル表現型His+、βGal+を有していた。

実施例3：バンクのプラスミドの単離

CAPPと相互作用し得るタンパク質を同定するために、ダブルハイブリッドスクリーニングによって選択された酵母に含まれている融合バンクのプラスミドを抽出した。このプラスミ

ドを大量に得るためにには、単離に先立って大腸菌を陽性酵母菌株のDNA抽出物によって形質転換しておくことが必要であった。この抽出物に含まれていたバンクのプラスミドは酵母／大腸菌シャトルプラスミドなので、細菌中で容易に複製され得る。同じく酵母中に存在するプラスミドGAL4DB-CAPPが単離されないように、該プラスミドを含まない菌株を使用した。

DNA抽出物による酵母の形質転換後に得られた細菌コロニーのプラスミドDNAを、制限酵素消化及びDNAフラグメントノのアガロースゲル分離によって分析した。分析した5つのクローン（7D、3E、9A、3H、3G）（図2）で3つの異なる制限プロファイルが得られた。これらの結果は、クローン7Dの異なる2つの酵母クローンとクローン3H及び3G中には少なくとも2つの等しいプラスミドが存在することを示した。クローン3EのDNAは表現型Hi^s及び β GAL⁺の菌株から得られる。

実施例4：同定されたプラスミドのインサートの配列の決定

脳cDNAバンクの挿入部位の近傍のEcoRI部位から52bp離れたGAL4TA領域に相補的なオリゴヌクレオチド（配列5）から配列決定を行った。

3つの配列を所与のバンクGENBank及びEMBL（European Molecular Biology Lab）に含まれている配列と比較すると、菌株9A及び3Hに由来のプラスミド中に存在していた配列2で示すcDNAの配列がFE65タンパク質をコードするマウス遺伝子に核酸レベルで87%の相同意有しており、菌株7Dに由来のプラスミドの配列が同じ遺伝子に60%の相同意有していることが判明した（図3参照）。菌株9A及び3Hに由来のプラスミドの配列を分析すると、これらのプラスミドが同一mRNAに対応する2つのオーバーラップ領域を含むことが判明する。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1500

配列の型：スクレオチド

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

配列番号：2

配列の長さ：1275

配列の型：スクレオチド

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

CGG GAG GAG TCC CAG CTC ACC TGG ACA GGT TTT GCT GAT GGA GAA GGC	48
Arg Glu Glu Ser Gln Leu Thr Trp Thr Gly Phe Ala His Gly Glu Gly	
1 5 9 10 14 15	

TTT GAG GAT GGA GAA TTT TGG AAG GAT GAA CCC ACT GAT GAG GCC CCA	96
---	----

Phe	Glu	Amp	Gly	Glu	Phe	Trp	Lys	Asp	Glu	Pro	Ser	Asp	Glu	Ala	Pro	
20					25					30						
ATG	GAG	CTG	CGA	CTG	AAG	CCT	GAG	GAG	GGG	ACG	TTG	ACC	TTC	CCA	144	
Met	Glu	Leu	Gly	Leu	Lys	Glu	Pro	Glu	Glu	Gly	Thr	Leu	Thr	Phe	Pro	
35					40					45						
GCT	CAG	AGC	CTC	AGC	CCA	GAG	CCG	TTG	CCC	CAA	GAG	GAG	GAG	AAG	CTT	192
Ala	Gln	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu	Pro	Leu	Pro	Gln	Glu	Glu	Glu	Lys	Leu	
50					55					60						
CCC	CCA	CGG	AAT	ACC	AAC	CCA	GGG	ATC	AAG	TGT	TTC	GCC	GTC	CGC	TCC	240
Pro	Pro	Arg	Asn	Thr	Asn	Pro	Gly	Ile	Lys	Cys	Phe	Ala	Val	Arg	Ser	
65					70					75				80		
CTA	GCC	TGG	GTA	GAG	ATG	ACC	GAG	GAG	GAC	CTG	GCC	CCT	CCA	CCC	ACC	288
Leu	Gly	Trp	Val	Glu	Glu	Met	Thr	Glu	Glu	Leu	Ala	Pro	Gly	Arg	Ser	
85					90					95						
AGT	GTG	GCA	GTC	AAC	AAT	TGC	ATC	CGT	CAC	CTC	TCT	TAC	CAC	AAA	AAC	336
Ser	Val	Ala	Val	Asn	Asn	Cys	Ile	Arg	Gln	Leu	Ser	Tyr	.His	Lys	Asn	
100					105					110						
AAC	CTG	CAT	GAC	CCC	ATG	TCT	GGG	GCC	TGG	GGG	GAA	GGA	AAG	GAT	CTG	384
Asn	Leu	His	Asp	Pro	Met	Ser	Gly	Gly	Trp	Gly	Glu	Gly	Lys	Asp	Leu	
115					120					125						
CTA	CTG	CAG	CTG	GAG	GAC	ACA	CTA	AAG	CTA	GTG	GAG	CCA	CAG	AGC	432	
Leu	Leu	Gln	Leu	Glu	Asp	Glu	Thr	Leu	Lys	Leu	Val	Glu	Pro	Gln	Ser	
130					135					140						
CAG	GCA	CTG	CTG	CAC	GCC	CAA	CCC	ATC	ATC	AGC	ATC	CGC	GTG	TGG	GCC	480
Gln	Ala	Leu	Leu	His	Ala	Gln	Pro	Ile	Ile	Ser	Ile	Arg	Val	Trp	Gly	
145					150					155				160		
GTC	GGG	CGG	GAC	AGT	GGG	AGA	GAG	AGG	GAC	TAC	GCC	TGT	GCT	CGT	528	
Val	Gly	Arg	Asp	Ser	Gly	Arg	Glu	Arg	Asp	Phe	Ala	Tyr	Val	Ala	Arg	
165					170					175						
GAT	AAG	CTG	ACC	CAG	ATG	CTC	AAG	TGC	CAC	GTG	TTT	CGC	TGT	GAG	GCA	576
Asp	Lys	Leu	Thr	Gln	Met	Leu	Lys	Cys	His	Val	Phe	Arg	Cys	Glu	Ala	
180					185					190						
CCT	GCC	AAG	AAC	ATC	GCC	ACC	AGC	CTG	CAT	GAG	ATC	TGC	TCT	AAG	ATC	624
Pro	Ala	Lys	Asn	Ile	Ala	Thr	Ser	Leu	His	Glu	Ile	Cys	Ser	Lys	Ile	
195					200					205						
ATG	GCC	GAA	CGG	GGT	AAT	GCC	CGC	TGC	TTC	GTA	AAT	GGA	CTC	TCC	CTG	672
Met	Ala	Glu	Arg	Gly	Asn	Ala	Arg	Cys	Leu	Val	Asn	Gly	Leu	Ser	Leu	
210					215					220						
GAC	CAC	TCT	AAA	CCT	CTG	GAT	CTC	CCT	TTC	CAA	GTG	GAA	TTC	CCA	GCG	720
Asp	His	Ser	Lys	Leu	Val	Asp	Val	Pro	Phe	Gln	Val	Glu	Phe	Pro	Ala	
225					230					235				240		
CCT	AAG	ATG	GAG	TTG	GTC	CAG	AAG	TTC	CAA	GTC	TAT	TAC	CTG	GGG	AAT	768
Pro	Lys	Asn	Glu	Leu	Val	Gln	Lys	Phe	Gln	Val	Tyr	Tyr	Lys	Gly	Asn	
245					250					255						

GTA CCT GTT GCT AAA CCT GTT GGG GTC GAT GTG ATT AAT GGG GCC CTC	816		
Val Pro Val Ala Lys Pro Val Gly Val Asp Val Ile Asn Gly Ala Leu			
260	270		
GAG TCA GTC CTG TCC TCC AGC AGC CGT GAA CAA TGG ACC CCC AGT CAT	864		
Glu Ser Val Leu Ser Ser Ser Arg Glu Gln Trp Thr Pro Ser His			
275	280	285	
GTC AGT GTG GCC CCT GCT ACC CTC ACC ATC TTG CAC CAG CAG ACA GAG	912		
Val Ser Val Ala Pro Ala Thr Leu Thr Ile Leu His Gln Gln Thr Glu			
290	295	300	
GCA GTC CTG CCA CAG TCT CGG GTG CGT TTC CTC TCC TTC CTC GCC GTG	960		
Ala Val Leu Gly Glu Cys Arg Val Arg Phe Leu Ser Phe Leu Ala Val			
305	310	315	320
GCC AGA GAT GTC CAC AGC TTT GCA TTC ATC ATG GCT GCC GGC CCA GCC	1008		
Gly Arg Asp Val His Thr Phe Ala Phe Ile Met Ala Ala Gly Pro Ala			
325	330	335	
TCC TTC TGC TGT CAC ATG TTC TGG TGC GAG CCC AAT GCT .GCC AGC CTC	1056		
Ser Phe Cys Cys His Met Phe Trp Cys Glu Pro Asn Ala Ala Ser Leu			
340	345	350	
TCA GAG CCT GTC CAG GCT CGG TGC ATG CTT CGC TAC CAG AAG TGT CTG	1104		
Ser Glu Ala Val Gln Ala Ala Cys Met Leu Arg Tyr Gln Lys Cys Leu			
355	360	365	
GAT GCC CGT TCC CAG GCC TCC ACC TCC TGC CTC CCA GCA CCC CCT GCT	1152		
Asp Ala Arg Ser Gln Ala Ser Thr Ser Cys Leu Pro Ala Pro Pro Ala			
370	375	380	
GAG TCT GTG GCA CGG GGT GTA GGG TGG ACT GTC CGC AGG GGT GTT CAG	1200		
Glu Ser Val Ala Arg Gly Val Gly Trp Thr Val Arg Arg Gly Val Gln			
385	390	395	400
TCG CTG TGG GGC TCC CTG AAG CCC AAA CGG GTG GGG GGC CAT ACC CCA	1248		
Ser Leu Trp Gly Ser Leu Lys Pro Lys Arg Val Gly Gly His Thr Pro			
405	410	415	
TGA AGA AGC CCC ACC TTC CCT CCA CCT	1275		
* Arg Ser Pro Thr Phe Pro Pro			
420	425		

配列番号：3

配列の長さ：27

配列の型：ヌクレオチド

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類 : c D N A

配列

CAAGTCGACC TAGTTCTGCA TCTGCTC

27

配列番号 : 4

配列の長さ : 27

配列の型 : ヌクレオチド

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

配列

CAAGAATTCA AGAAACAGTA CACATCC

27

配列番号 : 5

配列の長さ : 23

配列の型 : ヌクレオチド

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

配列

CTATTCGATG ATGAAGATAAC CCC

23

【図 1】

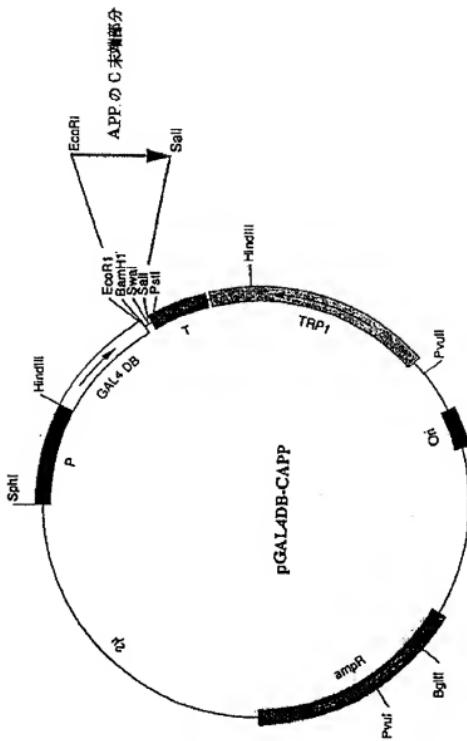


Figure 1

【図2】

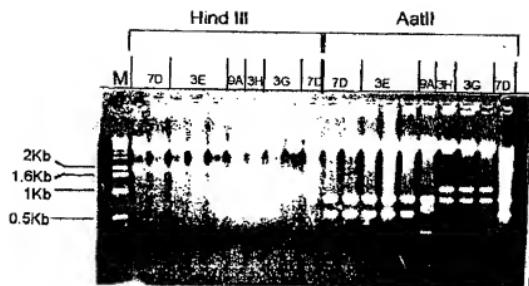


Figure 2

【図3】

FE65 ラット	LSPEPLPQEEEKLPPIRNTNP.GIKCFAVRSLL	
菌株 9A,3H に由来の配列	LSPEPVPEEEENLPQRNANPGIRCKFAVRSLL	*
菌株 TD に由来の配列	LRNAPHPD-DDSSCSINSDEAKCWAVERSL	*
FE65 ラット	GWVEMTEELAPGRSSVAVNNCIRQLSYHKN	*
菌株 9A,3H に由来の配列	GWVEMTEELAPGRSSVAVNICIRQLSYHKN	*
菌株 TD に由来の配列	GWVEMAEEDLAPGKSSVAANNNCIRQLSYCKN	*

Figure 3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 96/01775

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/12 C07K14/47 C12N15/62 A61K38/17 C07K16/18 G01N33/68 C12Q1/68 C12N15/86 //C12N15/11				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C97K A61K C12Q G01N				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category * Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.
X	WO 94 19692 A (GEN HOSPITAL CORP) 1 September 1994 see the whole document ---			
X	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, (1996 NOV) 16 (11) 6229-41., XP000676581 BORG J P ET AL: "The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein." see the whole document ---			
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.				
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date of the application "C" document which may show doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or sale "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed				
Date of the actual completion of the international search		Date of sending of the international search report		
26 June 1997		18.07.97		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Potsdam 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax. 31 651 epo nl. Fax. (+31-70) 340-2015		Authorized officer Andres, S		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 96/01775

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1995 DEC 29) 270 (52) 30853-6, XP002907462 FIORE, F. ET AL.: "The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein." see the whole document ---	1-5,7-9
A	HUMAN MOLECULAR GENETICS, (1996 OCT) 5 (10) 1589-98., XP002033791 BRESSLER, S. ET AL.: "cDNA cloning and chromosome mapping of the human Fe65 gene: interaction of the conserved cytoplasmic domains of the human beta-amyloid precursor protein and its homologues with the mouse Fe65 protein." see the whole document ---	1-21
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (1991 OCT 11) 19 (19) 5269-74., XP002002141 DULIO, A. ET AL.: "A rat brain mRNA encoding a transcriptional activator homologous to the DNA binding domain of retroviral integrases." cited in the application ---	
E	FR 2 740 454 A (RHONE POULENC RORER SA) 30 April 1997 see the whole document ---	1-21
T	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1997 MAR 7) 272 (10) 6399-405. XP002033792 ZAMBRANO, N. ET AL.: "Interaction of the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding-related domains of Fe65 with wild-type and mutant Alzheimer's beta-amyloid precursor proteins." see the whole document -----	1-3,5,7, 9,20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. Application No.
PCT/FR 96/01775

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9419692 A	01-09-94	US 5578451 A	26-11-96
FR 2746454 A	30-04-97	None	

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	7	識別記号	F I	テマコード (参考)
A 6 1 P	25/00		A 6 1 P	25/28
	25/28			43/00
	43/00	1 1 1	C 0 7 K	14/47
C 0 7 K	14/47			16/18
	16/18		C 1 2 Q	1/68
C 1 2 Q	1/68		A 6 1 K	37/02